临床研究

肾移植受者侵袭性曲霉菌感染的早期血清学诊断

石向华,范礼佩,刘 丁,李留洋,李 民
南方医科大学珠江医院器官移植中心,广东 广州 510282

摘要:目的 探讨1,3-β-D葡聚糖(BG)与半乳甘露聚糖(GM)在肾移植受者侵袭性曲霉菌感染(IA)早期血清学诊断中的临床价值。**方法** 收集69例肾移植受者的血液标本,分成:确诊组、临床诊断组、拟诊组和非感染组,对4组血液样本进行检测及统计学分析。**结果** 确诊组、临床诊断组、拟诊组的BG浓度显著高于对照组($P<0.05$),其敏感性、特异性阳性预测值、阴性预测值分别为69.49%、70%、93.18%、35.71%。3组的GM浓度亦显著高于对照组($P<0.05$);其敏感性、特异性阳性预测值、阴性预测值分别为84.75%、90%、96.15%、52.63%。**结论** 血中的BG和GM浓度检测可以作为肾移植受者IA的早期诊断依据之一,浓度升高提示发生感染的可能。同时行BG实验与GM检测能提高诊断效能,减少漏诊。

关键词:肾移植;侵袭性曲霉菌感染;1,3-β-D葡聚糖;半乳甘露聚糖

Early serological diagnosis of invasive aspergillosis in renal transplant recipients

SHI Xianghua, FAN Lipei, LIU Ding, LI Liuyang, LI Min
Department of Organ Transplantation, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China

Abstract: Objective To evaluate the clinical value of serum 1,3-beta-D-glucan (BG) and galactomannan (GM) detection for early diagnosis of invasive aspergillosis (IA) in patients after renal transplantation. **Methods** Blood samples collected from 69 renal transplant recipients were divided into diagnosis group, clinical diagnosis group, suspected diagnosis group, and non-infected group for detection of serum BG and GM. **Results** The mean serum levels of BG in the diagnosis group, clinical diagnosis group, and suspected diagnosis group were significantly higher than that in non-infected group ($P<0.05$). The sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values of BG was 69.49%, 70%, 93.18% and 35.71% for IA diagnosis, respectively. The serum levels of GM in the 3 diagnosis groups were also significantly higher than that in the non-infected group ($P<0.05$) with the sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values of 84.75%, 90%, 96.15% and 52.63% for IA diagnosis, respectively. **Conclusion** Increased serum BG and GM levels can serve as the evidence for early diagnosis of IA with a high diagnostic sensitivity and specificity in renal transplant recipients..

Key words: renal transplant; invasive aspergillosis; 1,3- beta-D-glucan; galactomannan

随着实体器官移植及造血干细胞移植等技术的广泛开展、免疫抑制剂的大量应用、导管介入及导管留置技术的广泛开展及人类免疫缺陷病毒(HIV)在全球的持续蔓延,侵袭性真菌感染(IFI)的发病率及死亡率在全球范围内显著上升[1-4]。IFI已成为器官移植受者移植物丢失及受者死亡的主要原因之一[5]。IFI起病以念珠菌和曲霉菌最常见,其中的曲霉菌等丝状真菌感染真菌培养很难有阳性结果、实验室诊断水平远不能满足临床需求[6-8]。早期诊断器官移植受者侵袭性曲霉菌感染(IA)对早期及抢先治疗IA,避免移植物丢失,提高受者生存率意义重大。本研究拟通过检测肾移植受者血清1,3-β-D葡聚糖(BG)的浓度(BG检测)与血清半乳甘露聚糖(GM)的浓度(GM检测),探讨两种方法在移植受者侵袭性曲霉菌感染(IA)诊断中的临床价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料和分组

常规收集珠江医院2012年1月~2014年12月肾移植患者术后病房及门诊常规复诊患者系列血液标本,按入选标准选取69例肾移植受者的血液标本。

69例受者中:男性38例,女性31例;受者最小年龄22,最大年龄88岁,中位年龄51.8岁;首次移植64例,二次移植5例;尸体移植63例,亲属移植6例。原发病为慢性肾小球肾炎54例,糖尿病肾病6例,高血压肾病4例,多囊肾3例,梗阻性肾病2例。

供肾热缺血时间最短1 min,最长为9 min,平均为5.43±2.72 min;冷缺血时间最短为0.5 h,最长为28 h,平均为8.92±4.53 h。组织配型为供受者ABO血型均相容,HLA配型符合可允许错配原则,淋巴细胞毒实验(CDC)均为阴性,群体反应性抗体(PRA)<10%者 61

收稿日期:2015-05-21
基金项目:广东省医学科学技术研究基金(WSTJJ20101201362101197808290619)
作者简介:石向华,硕士,主治医师,E-mail: sxh96@hotmail.com
通信作者:李 民,博士,副主任医师,E-mail: 1348172285@qq.com

例、10%<PRA<49%者5例、PRA>50%者3例。免疫抑制方案为:环孢素(CSA)+霉酚酸酯(MMG)+泼尼松(Pred)或他克莫司(FK506)+霉酚酸酯(MMG)+泼尼松(Pred)三联免疫抑制方案。

根据实体器官移植患者侵袭性真菌感染的诊断和指南[4]将患者分成:确诊、临床诊断、拟诊和非感染组。对照组采用排除IA病人标本。排除标准为:(1)未确诊或临床诊断非曲霉菌感染;(2)抗真菌治疗无效而换用抗生素或免疫抑制剂治疗有效,不符合微生物诊断标准或痰等标本中培养出致病性细菌者。69例患者中对照组病例10例,男性5例,女性5例,病人均经临床证实为非曲霉菌感染患者。余59例患者中感染部位:肺部47例、鼻腔鼻窦感染2例、神经系统1例、泌尿系4例、皮肤2例、多器官受累3例(肺-皮肤、肺-皮肤-脑、肺-鼻窦-脑各1例),其中最常见感染部位为肺部占84.74%。感染发生时间分布:术后1~3个月 11例(18.64%),术后3~6个月 35例(59.32%),术后6~12个月 3例(5.1%),术后12个月以后10例(16.95%)。4例病理学确诊IA病例(肺穿刺活检病理证实2例、移植肾动脉血管病理证实1例、切口局部病理证实1例)男女各2例;临床诊断IA病例31例,男性18例、女性13例;拟诊IA病例24例,男性13例、女性11例。

1.2 样本处理和检测

所有研究对象空腹抽血5 mL,切口置室温30 min待血液凝固。2720 g/min 4 ℃离心10 min后吸取上清,用于检测。BG检测采用Glucatell试剂盒(Bio-Rad公司产品),GM测定采用Platelia-Aspergillus试剂盒(Bio-Rad公司产品)。操作严格按照试剂盒说明进行,每一次操作均设的阳性及阴性对照,由同一位研究人员独立进行。

1.3 结果判定

1.3.1 BG检测结果判定 血清1,3-β-D-葡聚糖浓度高于20 pg/mL为阳性,否则为阴性。

1.3.2 GM检测结果判定 每次实验均必须以标准血清A值均值于0.3~0.8之间、阳性对照A值/标准A值均值>1.5、阴性对照A值 / 标准A值均值<O.5作为实验内质控。被检血清的GM值计算公式为:被检血清A值/标准血清A值,GM值<l为阴性,l<GM值<1.5为可疑阳性,GM值>1.5为阳性。

1.4 统计学方法

用SPSS19.0软件进行统计分析。所有数据均采用均数±标准差表示,统计学方法为单因素方差分析,*P*<0.05认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组1,3-β-D-葡聚糖(1, 3-beta-D-Glucan, BG)的检测结果

本次研究的人群中,确诊IA患者4例,临床诊断IA患者31例,拟诊IA患者24例,对照组为10例,而各组血浆1,3-β-D葡聚糖的阳性例数分别为4例,23例,14例与3例。血清BG的敏感性是:69.49%,特异性是70%,阳性预测值是93.18%,阴性预测值是35.71%。而各组血浆1,3-β-D葡聚糖的浓度(表1)可以看出:和对照组相比,其他3组的BG浓度均明显升高,具有显著差异(*P*=0.000),和确诊IA组相比,临床诊断IA组和拟诊IA组也有统计学差异(*P*=0.000),而临床诊断IA组和拟诊IA组之间浓度无显著差异(*P*=0.416)。

表1 各组血浆1,3-β-D葡聚糖的浓度

Tab.1 Serum levels of 1,3-beta-D-glucan in different groups

Group	Sample size (case)	Sample's concentration (pg/mL)
Confirmed diagnosis	4	61.01±2.36
Clinical diagnosis	31	30.02±9.96
Recommended diagnosis	24	25.41±9.61
Non-infected group	10	9.82±2.38
F		33.175
P		0.000

2.2 各组半乳甘露聚糖的检测结果

本次研究的人群中,确诊IA患者4例,临床诊断IA患者31例,拟诊IA患者24例,对照组为10例,而各组血浆半乳甘露聚糖的阳性例数分别为4例,28例,18例与1例。血清半乳甘露聚糖的敏感性是:84.75%,特异性是90%,阳性预测值是96.15%,阴性预测值是52.63%。表2中各组血浆半乳甘露聚糖的浓度显示,其他3组的血浆半乳甘露聚糖浓度和对照组相比,显著升高(*P*=0.000);而且确诊组、临床诊断组和拟诊组之间也均有显著差异(*P*=0.000,*P*=0.001)。

表2 各组血浆半乳甘露聚糖的浓度

Tab.2 Serum levels of galactomannan in different groups

Group	Sample size (case)	Sample's concentration (pg/mL)
Confirmed diagnosis	4	3.58±0.11
Clinical diagnosis	31	2.56±0.77
Recommended diagnosis	24	1.79±0.68
Non-infected group	10	0.38±0.11
F		35.989
P		0.000

3 讨论

BG是除隐球菌、接合菌外,所有酵母菌及丝状真菌细胞壁上的一种成分,能特异度激活G因子,从而激活鲎试验,此过程称为G试验。检测血BG水平是预示真菌感染的一项有效指标。Odabasi等[9-11]经研究确

定血浆BG水平≥60 pg/mL为阳性界值,其敏感度为97%,特异度93%,发现检测该真菌抗原比临床确诊真菌败血症平均提前10 d,G试验可作为IFI的一种有效筛查方法,具有早期诊断价值。本次研究将BG的浓度≥20 pg/mL为阳性界值[12],结果显示,4例确诊者的血清G试验均为阳性,31例临床诊断的患者中23例阳性,24例拟诊组中14例阳性,对照组中有3例假阳性。BG的敏感性是:9.49%,特异性是70%,阳性预测值是93.18%,阴性预测值是35.71%。3组患者的血清1,3-β-D葡聚糖均高于BG)对照组,且确诊IA组的浓度显著高于临床诊断IA组和拟诊IA组,但临床诊断IA组和拟诊IA组之间无显著差异。

GM是曲霉菌细胞壁的一种热稳定性多糖蛋白,当曲霉菌在组织中侵袭、生长时可释放入血,研究发现,IA患者GM阳性表达可早于临床表现和影像学改变前数天。抗真菌治疗后血清GM升高预示预后不良[13]。GM试验主要适用于免疫功能受损者侵袭性曲霉菌病的诊断,动态观察结果变化更有诊断价值。目前国内外广泛用于侵袭性曲霉菌感染的抗原诊断试剂盒的灵敏度在29%~100%之间。由于该抗原与多种机会真菌、细菌(如双歧菌属)、药物(半合成青霉素等)存在广谱的交叉反应[14-15],会导致检测出现假阳性。而血循环中的GM非持续性存在、会被很快清除,卡泊芬净使用以及肺曲霉球的存在等因素均可导致假阴性结果[16]。本次研究结果显示,4例确诊者的血清GM试验均为阳性,31例临床诊断的患者中28例阳性,24例拟诊组中18例阳性,对照组中有1例假阳性。血清半乳甘露聚糖的敏感性是:84.75%,特异性是90%,阳性预测值是96.15%,阴性预测值是52.63%。和对照组相比,其他3组的GM浓度均显著升高;在这3组人群中,确诊组的浓度显著高于临床诊断组和拟诊组,临床诊断组的GM浓度亦高于拟诊组,差异有统计学意义。

本研究结论如下:BG检测和GM检测在侵袭性曲霉菌的诊断中有较高的敏感性和特异性,且阳性预测值均能达到90%以上。和BG检测相比,GM检测的灵敏度和特异性更高。血中的1,3-β-D葡聚糖和半乳甘露聚糖可以作为侵袭性曲霉菌的诊断依据之一,浓度升高提示发生感染的可能。同时开展BG检测和GM检测能提高诊断效能,减少漏诊。

参考文献:

[1] Lortholary O, Gangneux JP, Sitbon K, et a1. Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France: the SAIF network (2005-2007)[J]. Clin Microbiol Infect, 2011, 17(12): 1882-9.

[2] Bergeron A, Porcher R, Sulahian A, et al. The strategy for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis should depend on both the underlying condition and the leukocyte count of patients with hematologic malignancies[J]. Blood, 2012, 119(8): 1831-7.

[3] Montagna MT, De Giglio O, Napoli C, et al. Invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies (Aurora project): lights and shadows during 18-months surveillance[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(1): 774-87.

[4] 中华医学会器官移植学分会. 实体器官移植患者侵袭性真菌感染的诊断和治疗指南[J]. 中华器官移植杂志, 2009, 30(7): 440-1.

[5] 朱有华. 解读《实体器官移植患者侵袭性真菌感染的诊断和治疗指南》[J]. 中华移植杂志: 电子版, 2010, 30(1): 75-7.

[6] 张 宏, 廖万清, 郭宁如. 实用临床真菌病学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2009: 10-8.

[7] Lai CC, Tan CK, Huang YT, et al. Current challenges in the management of invasive fungal infections[J]. J Infect Chemother, 2008, 14(2): 77-85.

[8] Gueret R, Patel GR, Smion D. Invasive aspergillosis case report and review of the approach to diagnosisand treatment[J]. Clin Pulm Med, 2007, 14(3): 197-205.

[9] Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, et al. Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal Infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome[J]. Clin Infect Dis, 2004, 39(2): 199-205.

[10] Lunel FM, Mennink-Kersten MA, Ruegebrink D, et al. Value of Candida serum markers in patients with invasive candidiasis after myeloablative chemotherapy[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2009, 64(4): 408-415

[11] Alexander BD, Smith PB, Davis RD, et al. The (1, 3) β-D-glucan test as an aid to early diagnosis of invasive fungal infections following lung transplantation[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(11): 4083-8

[12] 余 进, 李若瑜, 高露娟, 等. 血清半乳甘露聚糖和血浆(1,3)β-D-葡聚糖检测诊断侵袭性真菌感染[J]. 中华医学杂志, 2010, (6): 371-4.

[13] 姚佳峰, 苏 东, 黄 勇, 等. 血清半乳甘露聚糖试验对侵袭性曲霉菌感染早期诊断和治疗的价值[J]. 中华血液学杂志, 2009, 30: 592-5.

[14] Rácil Z, Kocmanová I, Wagnerová B, et al. The use of galactomannan detection in diagnosing invasive aspergillosis in hemato-oncological patients[J]. Vnitr Lek, 2008, 54(1): 45-52.

[15] Cordonnier C, Botterel F, Ben Amor R, et al. Correlation between galactomannan antigen levels in serum and neutrophil counts in haematological patients with invasive aspergillosis [J]. Clin Microbiol Infect, 2009, 15(1): 81-6.

[16] 王剑磊. 侵袭性曲霉病的临床诊断[J]. 中国药物与临床, 2011, 1(1): 54-6.

(编辑:经 媛)